

О МАССОВОМ РАЗВЕДЕНИИ ЭНТОМОПАТОГЕННОГО
НЕМАТОДНО-БАКТЕРИАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА

Г. В. Веремчук

Всесоюзный научно-исследовательский институт защиты растений,
Ленинград

Нематоды рода *Neoaplectana* симбиотически связаны с бактериями, присутствие которых определяет вирулентность культуры нематод. При массовом культивировании *Neoaplectana carpocapsae agriotos*, выделенных нами из щелкунов, на вошинной моли были усовершенствованы некоторые приемы в заражении насекомых нематодами, хранении культуры и методы повышения продуктивности среды.

Энтомопатогенные нематоды семейства *Steinernematidae* инокулируют в полость тела насекомых бактерий, что послужило поводом к названию культуры нематодно-бактериальным комплексом. Это семейство нематод представлено двумя родами. Первый род — *Steinernema* Travassos, 1927 состоит из одного вида, найденного в полости тела пилильщика *Cephalia abietis* и первоначально описанного как *Aplectana kraussei* Steiner, 1923. Нематоды этого вида находятся в коллекциях США в виде фиксированного материала. Большой интерес представляет второй род — *Neoaplectana* Steiner, 1929, состоящий из 15 видов, из которых два — *N. glaseri* и *N. carpocapsae* культивируются на питательных средах. Для борьбы с насекомыми за рубежом применяется штамм ДД-136, а в СССР — штамм «*agriotos*». Оба штамма относятся к *N. carpocapsae* (см. таблицу).

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕМАТОД РОДА НЕОАПЛЕКТАНА

Нематоды рода *Neoaplectana* заражают насекомых перорально и перкутанно инвазионными личинками, так называемыми «Dauerlarven», представляющими собой личинок третьего возраста, не сбрасывающих личинную кутикулу при наступлении неблагоприятных условий. Дополнительная оболочка, запас питательных веществ в кишечнике и анабиотическое состояние позволяют им долгое время существовать без питания. Инвазионные личинки начинают развитие только в полости тела насекомых, выделяя из своего кишечника постоянно присутствующих бактерий-симбионтов, и питаются продуктами их жизнедеятельности.

Количество личинок, проникающих в насекомых, сильно варьирует и зависит от дозы инфекции. Зараженное насекомое погибает через 30—36 час. от септицемии, развитие нематод продолжается в трупах. За короткий период жизни зараженных насекомых нематоды успевают достигнуть четвертого возраста, а в некоторых случаях — пятого.

Продолжительность жизненного цикла неоаплектан ограничивается 7—8 днями при 20—22°. Оптимальные температурные условия развития установлены несколькими авторами (Веремчук, 1963; Schmiede, 1963). С повышением температуры окружающей среды темпы развития ускоряются, цикл развития может завершаться в 4—5 дней при 30—32°. Тем-

Список видов рода *Neoaplectana*

Название вида	Насекомое-хозяин	Место нахождения	Используется ли для борьбы с насекомыми
<i>N. glaseri</i> Steiner, 1929	<i>Popillia japonica</i> Neum.	США	Ранее использовался; сейчас аксеническое культивирование, бактерии-симбионты отсутствуют
<i>N. menozzii</i> Travassos, 1932	<i>Conorrhynchus mendicus</i> Gyllot.	Италия	Не используется; хранится в коллекции в фиксированном виде
<i>N. feltiae</i> Filipjev, 1934	<i>Agrostis segetum</i> Schiff.	СССР (Кировская обл.)	То же
<i>N. chresimma</i> (Steiner) Glaser, McCoy, Girth, 1942	<i>Heliothis armigera</i> F.	США	» »
<i>N. bibionis</i> Bovien, 1937	<i>Bibio ferruginatus</i> L. <i>Dilophus vulgaris</i> L.	Дания	» »
<i>N. affinis</i> Bovien, 1937	<i>B. ferruginatus</i> L., <i>B. hortulanus</i> L., <i>D. vulgaris</i> L.	»	» »
<i>N. leucaniae</i> Hoy, 1954	<i>Leucania acontistis</i> Meyr.	Новая Зеландия	» »
<i>N. bothynoderi</i> Kirjanova et Putschkova, 1955	<i>Bothynoderes punctiventris</i> Germ.	УССР (Полтавская обл.)	» »
<i>N. janichii</i> Weiser et Kohler, 1955	<i>Acantholyda nemoralis</i> Thoms.	Польша (Силезия)	» »
<i>N. carpocapsae</i> Weiser, 1955 1-й штамм чехословацкий	<i>Carpocapsa pomonella</i> L.	Чехословакия	Не используется; аксеническое культивирование, бактерии-симбионты отсутствуют
2-й штамм DD-136 (Poinar, 1967)	» »	США	Используется; культивируется на насекомых и искусственных средах
3-й штамм « <i>agriotos</i> » (Пойнар, Беремчук, 1970), syn. <i>N. agriotos</i> Veremtschuk, 1969	<i>Agriotes lineatus</i> L.	СССР (Ленинградская обл.)	Используется; культивируется на насекомых
<i>N. melolonthae</i> Weiser, 1958	<i>Melolontha melolontha</i> L.	Чехословакия (Моравия)	Не используется; хранится в коллекции в фиксированном виде
<i>N. arenaria</i> Artuchovsky, 1967	<i>Melolontha hippocastani</i> F.	СССР (Воронежская обл.)	То же
<i>N. georgica</i> Kakulia et Veremtschuk, 1965	<i>Amphimallon solstitialis</i> L.	ГрузССР (Лагодехский район)	» »
<i>N. kirjanovae</i> Veremtschuk, 1969	<i>Elateridae</i>	СССР (Ленинградская обл.)	» »
<i>N. belorussica</i> Veremtschuk, 1969	<i>Athous niger</i> L.	БССР (Минская обл.)	» »

пературы выше 33° уменьшают скорость развития, и при 40° наступает состояние теплового шока и смерть.

В насекомых развитие неоаплектан проходит в двух поколениях и завершается массовой миграцией личинок третьего возраста. Имаго, развившиеся внутри насекомых от инвазионных личинок, в 2—3 раза крупнее взрослых следующих поколений.

Впервые о трофической связи неоаплектан и бактерий упоминается в работе Датки и Хафа (Dutky and Hough, 1955). Их высказывания основывались только на предположении. Изучение бактерий начато Вайзером и Лысенко (Weiser, 1962; Lysenko, 1963). Из чехословацкого штамма *N. carpocapsae* были выделены разные виды бактерий. Другая группа ученых в США занималась выделением и определением бактерий-симбионтов из нематод этого же вида американского штамма ДД-136 (Poinar and Thomas, 1965). Выделен и описан новый и единственный вид бактерий — *Achromobacter nematophilus*. Установлена локализация у инвазионных личинок нематод в переднем отделе кишечника. Подобные исследования проводились и в СССР. Из нематод *N. carpocapsae agriotos* были выделены бактерии-симбионты, похожие на *Ach. nematophilus*, определение которых будет опубликовано.

Бактерии-симбионты создают антибиотический фон, препятствующий развитию других бактерий и грибов. Благодаря этому, трупы насекомых, наполненные развивающимися нематодами, в нестерильных условиях находятся в хорошем состоянии до полной миграции инвазионных личинок. Такое положение может быть только при заражении живых, здоровых и неослабленных популяций насекомых и объясняется эволюционной адаптацией нематод к определенному виду бактерий. В больных, ослабленных и особенно в погибших насекомых уже созданы условия, благоприятные для развития других видов бактерий кишечной флоры, и в этом случае бактерии, симбионты нематод, размножиться не могут, и нематоды погибают.

Неоаплектаны штамма ДД-136 в лабораторных условиях патогенны для 100 видов насекомых из восьми отрядов: *Lepidoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, *Coleoptera*, *Orthoptera*, *Hemiptera*, *Isoptera* (Dutky and oth., 1964). Нематоды штамма «*agriotos*» в лабораторных условиях также заражают многие виды насекомых, относящиеся к разным отрядам. Подобная неспецифичность неоаплектан и бактерий-симбионтов позволяет культивировать их на разных питательных средах.

МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НЕОАПЛЕКТАН

Культивирование нематод рода *Neoaplectana* возможно как на искусственных средах, так и на насекомых. Глезеру принадлежит приоритет в разработке способа разведения нематод *N. glaseri* на твердых искусственных средах с использованием мясо-пептонного агара, кашки из сырого картофеля или мяса (Gläser, 1931, 1932, 1949). В каждую из сред добавлялась культура дрожжей. Сначала опыты проводились нестерильно, среда быстро загнивала и нематоды погибали. Нематод пересаживали на свежие среды через каждые 7—10 дней. В дальнейшем в среды стали добавлять антисептики, благодаря чему их культивирование на одной среде продлилось до двух недель. Столл предложил для культивирования неоаплектан жидкие среды из экстракта сырой печени с добавлением стерильных кусочков свежей печени или почек мышей, кроликов (Stoll, 1953a, 1953b). Аксеническое культивирование *N. glaseri* на средах Глезера и Столла способствовало уничтожению бактерий-симбионтов. Вследствие этого изменился патогенез у насекомых, зараженных нематодами этого вида.

Нами проводилось заражение гусениц воцинной моли *N. glaseri*, полученными из Чехословакии от д-ра Я. Вайзера. Оказалось, что нематоды развивались до половозрелых стадий в живых насекомых, которые погибали от них только на 20—25-й день, тогда как насекомые, зараженные нематодно-бактериальным комплексом, погибали через 30—36 час. от септицемии, и развитие нематод проходило в трупах насекомых.

В настоящее время проводятся исследования по использованию новых искусственных сред, предназначенных для одновременного культивирования нематод и бактерий-симбионтов (House, Welch and Cleugh, 1965). Однако наилучшие условия для размножения нематод достигаются при заражении насекомых. Стандартизация в разведении (Haydak, 1936) и бедность микрофлоры кишечника определили выбор воцинной моли (*Galleria mellonella*) в качестве среды для нематод *N. carpocapsae* штаммов ДД-136 и «*agriotos*».

МЕТОДИКА МАССОВОГО РАЗВЕДЕНИЯ НЕМАТОД N. CARPOCAPSAE ШТАММА «AGRIOTOS» НА НАСЕКОМЫХ

Массовое размножение нематодно-бактериального комплекса — ДД-136 на гусеницах воцинной моли проводится многими лабораториями за рубежом и основные технические сведения были опубликованы (Martignoni and Steinhaus, 1961; Dutky, Thompson and Cantwell, 1964). В настоящее время эта методика принята всеми специалистами, занимающимися разведением нематод рода *Neoaplectana*. Основные положения ее используются и для культивирования нематод штамма «*agriotos*», выделенного

нами из шелкоунов в 1966 г. в Ленинградской области (Веремчук, 1969). При культивировании этого штамма были разработаны и детализированы некоторые приемы в заражении насекомых и хранении нематод. Усовершенствована техника сбора культуры. Весь процесс разведения нематод делится на три этапа: заражение насекомых нематодами, сбор и очистка культуры нематод и хранение культуры нематод.

З а р а ж е н и е н а с е к о м ы х н е м а т о д а м и осуществляется в предварительно простерилизованных чашках Петри или в какой-нибудь другой посуде с сухой фильтровальной бумагой на дне, на которую размещают по 50—100 гусениц воцинной моли старшего возраста. Предварительно их анестезируют эфиром в течение 30 сек. Насекомых, предназначенных для заражения, опрыскивают пятью каплями насыщенной нематодной суспензией (в одной капле воды содержится 10^2 нематод). Чашки Петри с зараженными гусеницами выдерживают в термостате при 25—30°.

С б о р к у л ь т у р ы н е о а п л е к т а н. На 3-й день после заражения насекомые погибают от септицемии, вызванной бактериями-симбионтами. Для установления факта их гибели вскрытие гусениц следует проводить только на 5—6 день. В этом случае можно увидеть в проходящем свете (под биноклем) медленно выползающих в каплю воды самок до 8 мм длиной, более мелких самцов с темными спиккулами и большое количество личинок нового поколения.

Погибших гусениц, стараясь не повредить покровы, пинцетом переносят в нематодные ловушки, предназначенные для сбора инвазионных личинок. При случайном разрыве покровов нематоды выходят на поверхность трупов, и культура загрязняется разными возрастами нематод. Это ухудшает условия ее хранения.

Трупы гусениц выдерживают в нематодных ловушках при 24°, и через 15 дней получают массовую миграцию инвазионных личинок.

Конструкции нематодных ловушек могут быть различными и принцип устройства их основан на гидротаксисе нематод.

1. Половину чашки Петри, обернутую фильтровальной бумагой, помещают вверх дном в посуду большого объема, наполненную физиологическим раствором на уровне половины чашки. Трупы гусениц укладывают рядами по 100 шт. на поверхность чашки. Мигрирующие личинки по фильтровальной бумаге, переходят в физиологический раствор (Glaser, McCoy and Girth, 1942; Martignoni and Steinhaus, 1961). Однако фильтровальная бумага часто, становясь субстратом для размножения микроорганизмов, снижает выход культуры. Поэтому погибших гусениц целесообразнее раскладывать на стеклянную поверхность чашки. Высокая влажность в ловушке способствует сползанию мигрирующих личинок в физиологический раствор.

2. Трупы гусениц помещают на капроновую сетку, вставленную в воронку, в которую снизу подается физиологический раствор, смывающий мигрирующих нематод в сборный сосуд. Из ловушек физиологический раствор с нематодами сливают в цилиндры для очистки от примесей среды путем многократных осадений.

Х р а н е н и е к у л ь т у р ы н е о а п л е к т а н. Суспензию нематод сливают в бутылки и концентрация доводится до 10^5 нематод в 1 мл воды. С увеличением концентрации уменьшается срок хранения культуры. Бутылки с очищенной суспензией помещают в холодильник и аэрируют при помощи компрессора. Инвазионные личинки неоаплектан могут храниться в физиологическом растворе при 2—10° в течение 12 мес. и дольше.

Процесс обмена веществ не прекращается у инвазионных личинок и при анабиотическом состоянии. Микроскопическим анализом можно определить состояние культуры по степени прозрачности кишечника. С увеличением срока хранения запас питательных веществ в кишечнике уменьшается: темный в начале хранения кишечник светлеет, и нематоды погибают.

В результате нестерильного хранения нематод культура мутнеет от накопления размножающихся микроорганизмов (сапрофитные грибы, простейшие) и погибающих нематод. Рекомендуем очищать культуру 4 раза в год, а затем обновлять ее путем заражения насекомых.

Л и т е р а т у р а

- В е р е м ч у к Г. В. 1963. Некоторые результаты выращивания нематод *Neoaplectana* sp. на питательных средах. Гельминты человека, животных и растений и борьба с ними. К 85-летию акад. К. И. Скрыбина : 198—200.
- В е р е м ч у к Г. В. 1969. Новый вид энтомопатогенных нематод рода *Neoaplectana* (Rhabditida : Steinernematidae). Паразитол., 3 (3) : 249—252.
- П о й н а р Дж. О. и В е р е м ч у к Г. В. 1970. Новый штамм энтомопатогенных нематод и географическое распространение *Neoaplectana carpocapsae* Weiser (Rhabditida : Steinernematidae). Зоол. журн., 49 (7) : 966—969.
- D u t k y S. R. and H o u g h W. S. 1955. Note on a parasitic nematode from codling moth larvae, *Carpocarsa pomonella* (Lepidoptera, Olethreutidae). Proc. Entomol. Soc. Wash., 57 (5) : 244.
- D u t k y S. R., T h o m p s o n J. V. and C a n t w e l l G. E. 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 Nematode. J. Insect Pathol., 6 (4) : 417—422.
- G l ä s e r R. W. 1931. The cultivation of a nematode parasite of an insect. Science, 73 (3) : 614—615.
- G l ä s e r R. W. 1932. Studies on *Neoaplectana glaseri*, a nematode parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica*). New Jersey Dept. Agric. Bureau Plant Industry, Circular 211 : 1—34.
- G l ä s e r R. W. 1940. The bacteria-free culture of a nematode parasite. Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med., 43 : 512—514.
- G l ä s e r R. W., M c C o y E. E. and G i r t h H. B. 1942. The biology and culture of *Neoaplectana chresimma*, a new Nematode parasitic in insects. J. Parasitol., 28 (2) : 123—126.
- H a y d a k M. H. 1936. A food for rearing laboratory insects. J. Econ. Entomol., 29 : 1026.
- H o u s e H. L., W e l c h H. E. and C l e u g h T. B. 1965. Food medium of prepared dog biscuit for the mass-production of the nematode DD-136 (Nematoda, Steinernematidae). Nature (Engl.), 206 (486) : 847.
- L y s e n k o O. 1963. The mechanisms of pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula. I. The pathogenicity of Strain N-06 for larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Linnaeus). J. Insect Pathol., 5 (1) : 78—82.
- M a r t i g n o n i M. E. and S t e i n h a u s E. A. 1961. Laboratory exercises in insect microbiology and insect pathology : 1—75.
- P o i n a r G. O. 1967. Description and taxonomic position of the DD-136 nematode (Steinernematidae, Rhabditoidea) and its relationship to *Neoaplectana carpocapsae* Weiser. Proc. Helminthol. Soc. Wash., 34 (2) : 199—209.
- P o i n a r G. O. and T h o m a s G. M. 1965. A new bacterium, *Achromobacter nematophilus* sp. nov. (Achromobacteraceae : Eubacteriales) associated with a nematode. Internat. Bull. Bacteriol. Nomencl. and Taxon., 15 : 249—252.
- S c h m i e g e D. C. 1963. The feasibility of using an neoaplectanid nematode for control of some forest insect pests. J. Econ. Entomol., 56 (4) : 427—431.
- S t o l l N. R. 1953a. Axenic cultivation of the parasitic Nematode, *Neoaplectana glaseri*, in a fluid medium containing raw liver extract. J. Parasitol., 39 (4) Sec., 1 : 422—444.
- S t o l l N. R. 1953b. Continued infectivity for Japanese beetle grubs of *Neoaplectana glaseri* (Nematoda) after seven years axenic culture. Thapar commemoration volume, India : 259—268.
- W e i s e r J. 1955. *Neoaplectana carpocapsae* n. sp. (Anguillulata, Steinernematinae), novy cizopasnik housenek obalece jablcneho, *Carpocapsa pomonella* L. Vést. Ceskosl. spoleu. zool., 19 (1) : 44—52.
- W e i s e r J. 1962. Über die Benutzung der Nematoden zur biologischen Schädlingsbekämpfung. XI Internat. Kongr. Entomol., Wien, 2 : 880—882.

ON MASS REARING OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE-BACTERIAL COMPLEX

G. V. Veremchuk

S U M M A R Y

Nematodes of the genus *Neoaplectana* are characterized by a symbiotic connection with bacteria, the presence of which determines the virulence of the nematode culture. By mass cultivation of *Neoaplectana carpocapsae agrios* isolated from click beetles, using the wax moth as an object of infection, methods were improved for insect infection with nematodes, culture maintenance and medium productivity increase.